

10/523454  
Rec'd PCT/PTO 12 FEB 2004

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

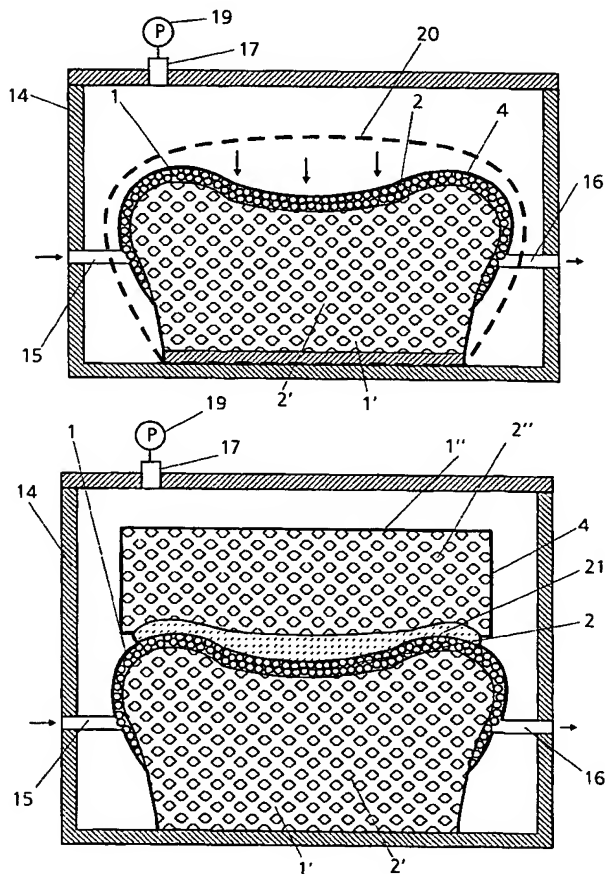
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/012782 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61L 27/38, C12M 3/06
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008325
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
28. Juli 2003 (28.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 34 742.5 30. Juli 2002 (30.07.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BIONETHOS HOLDING [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, 31275 Lehrte-Immensen (DE).
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BADER, Augustinus [DE/DE]; Hinter den langen Höfen 16, 31275 Lehrte-Immensen (DE).
- (74) Anwalt: LORENZ, Werner; Alte Ulmer Str. 2, 89522 Heidenheim (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, RU, SC, SD, SG, SL, TJ, TM, TN, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR CULTURING CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM ZÜCHTEN VON ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for culturing cells (2), according to which cells (2) are introduced into a cell culture chamber in order to form a cellular layer, said chamber being configured inside a carrier structure (1). The shape and size of the carrier structure (1) correspond at least approximately to the shape that is to be formed by the cells (2), such as an implant or a prosthesis. Nutrients and/or oxygen are fed to the carrier structure (1). The exterior of the carrier structure (1) is provided with a boundary membrane (4) that is impermeable to cells.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zum Züchten von Zellen (2) werden Zellen (2) zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum eingelegt, der im Inneren einer Trägerstruktur (1) gebildet wird, wobei die Trägerstruktur (1) in ihrer Form und Grösse wenigstens annähernd der durch die Zellen (2) zu bildenden Form, wie einem Implantat oder einer Prothese, entspricht. Der Trägerstruktur (1) werden Nährstoffe und/oder Sauerstoff zugeführt. Die Trägerstruktur (1) wird aussenseitig mit einer gegenüber Zellen undurchlässigen Grenzschicht (4) versehen.

WO 2004/012782 A1



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Identität des Erfinders (Regel 4.17 Ziffer i) für alle Bestimmungsstaaten
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CA, CN, CO, CR, CU, DM, DZ, EC, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, RU, SC, SD, SG, SL, TJ, TM, TN, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

#### Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

### Verfahren und Vorrichtung zum Züchten von Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten von Zellen, wobei die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum eingeleitet werden. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zum Züchten von Zellen und eine Trägerstruktur hierfür.

In der DE 199 35 643 A1 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Züchten von Zellen beschrieben, wobei Zellen auf einem Träger in einem formbaren Zellkulturraum zwischen Folien gezüchtet werden. Der Träger ist dabei mit den Folien in einem Behälter als Bioreaktor eingebracht, wobei Nährstoffe und Sauerstoff von außen zugeführt werden.

Ein ähnliches Verfahren und eine Vorrichtung hierzu ist auch aus der DE 197 19 751 A1 bekannt. Das Aufwachsen der Zellen erfolgt dabei mehr oder weniger "unkontrolliert". Die Größe der Vorrichtung wird durch den Behälter vorgegeben, in welchem sich die zu bildende Zellschicht bzw. ein Implantat befindet.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Züchten von Zellen zu schaffen, das sehr vielseitig einsetzbar ist, insbesondere wobei aus den Zellen gebildete Formen, wie Implantate oder Prothesen, in sehr komplexer Form und in exakt definierbarer Größe hergestellt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies bei einem Verfahren zum Züchten von Zellen, wobei die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum eingeleitet werden, derart gelöst, dass der Zellkulturraum im Inneren einer Trägerstruktur gebildet wird, wobei die Trägerstruktur in ihrer Form und Größe wenigstens annähernd der durch die Zellen zu bildenden Form, wie einem Implantat oder einer Prothese, entspricht, wobei der Trägerstruktur Nährstoffe und/oder Sauerstoff zugeführt wird und wobei die Trägerstruktur außenseitig mit einer gegenüber Zellen undurchlässigen Grenzschicht versehen wird.

Erfindungsgemäß stellt nunmehr die Trägerstruktur den eigentlichen Bioreaktor selbst dar, während bisherige Bioreaktoren lediglich bestimmte einfache geometrische Formen, wie z.B. rund oder quadratisch, flach oder flaschenförmig, besaßen. Durch die außenseitig gegenüber den Zellen undurchlässige Grenzschicht wird eine exakt definierte Zellkulturraumgröße und Form gegeben, wobei die Form und Größe selbst durch die Trägerstruktur vorgegeben wird. Dies bedeutet, man kann die Trägerstruktur exakt in der Form ausbilden, wie die zu bildende Form, z.B. das Implantat oder die Prothese, später in ihrem Endzustand aussehen soll. Das herzustellende Implantat ist praktisch vorgegeben. So kann man z.B. mit einem Computertomogramm, mit welchem z.B. ein defekter Wirbelkörper erkannt wird, diesen exakt als Trägerstruktur nachbilden. In die Trägerstruktur, die entsprechend mit der Grenzschicht versehen worden ist, werden dann die Zellen entsprechend eingebracht. Vorzugsweise ist hierzu die Trägerstruktur aus einem mikroporösen oder auch aus einem grobporösen Material gebildet. Dabei kann die Trägerstruktur als entfernbares oder auch als umwandelbares Platzhaltermaterial

ausgebildet sein, so dass sich die Zellschicht entsprechend dem gewünschten Implantat ausbilden kann.

Die Grenzschrift kann aus einem gegenüber den Zellen undurchlässigen Kunststoff gebildet sein, und hierfür z.B. durch Aufspritzen oder durch Tauchbad aufgebracht werden. Als geeignet hat sich z.B. flüssiges oder viskoses Polymer, Silikone, Polyurethane, Proteine, Alginat oder Harze herausgestellt.

Alternativ kann die Grenzschrift auch aus einem biologischen Material gebildet werden, wie z.B. aus einem Hydrogel oder Alginat. Bei Verwendung eines Alginates kann dieses in einer Kalziumchloridlösung polymerisiert und damit gegenüber Zellen undurchlässig gemacht werden. Zur nachfolgenden Entfernung und nach Fertigstellung des Implantates kann das polymerisierte Alginat in eine kalziumarme Lösung eingebracht werden, womit es sich wieder auflöst.

Sofern keine selbstauflösende Grenzschrift verwendet wird, kann man diese auch auf mechanische Weise nach Ende des Zellenzüchtverfahrens entfernen.

Vorteilhafte Weiterbildungen und Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen und aus den nachfolgend anhand der Zeichnung beschriebenen Ausführungsbeispielen.

Es zeigt:

Fig. 1 einen Wirbelkörper als zu bildendes Implantat in stark vereinfachter Darstellung;

- Fig. 2 ein Tauchbad für den Wirbelkörper nach der Fig. 1;
- Fig. 3 den Wirbelkörper nach der Fig. 1 mit einer Grenzschicht;
- Fig. 4 ein Lösungsbad für die Grenzschicht;
- Fig. 5 einen Behälter mit einer Nährmittellösung mit mehreren Implantaten;
- Fig. 6 ein Implantat in Röhrenknochenform;
- Fig. 7 ein Teilimplantat für eine Herzklappe;
- Fig. 8 das in der Fig. 3 dargestellte Implantat in einem Nährmittelkreislauf;
- Fig. 9 das in der Fig. 3 dargestellte Implantat in einem unter Druck setzbaren Behälter;
- Fig. 10 eine Trägerstruktur in Form eines Kniegelenkes in einem Behälter; und
- Fig. 11 die Trägerstruktur nach der Fig. 10 mit einer zusätzlichen Meniskusstruktur.

In der Fig. 1 ist schematisch die Form eines Wirbelkörpers dargestellt, an Hand dem nachfolgend die Erfindung näher beschrieben wird. Selbstverständlich ist der Wirbelkörper nur als ein mögliches Beispiel für eine Prothese oder ein Imp-

lantat anzusehen. Ausgangspunkt für den Wirbelkörper stellt eine Trägerstruktur 1 dar, die aus einem porösen Material, z.B. mikroporös oder auch grobporös, besteht. Als Material für die Trägerstruktur 1 kann ein stabiles, biodegradables oder auch remodelling-fähiges Material verwendet werden. So kann z.B. Knochenersatzmaterial oder auch Kalziumphosphat verwendet werden. Auch Kunststoffe und hybride Konstrukte, wobei ein technisches Material mit einem biologischen Material kombiniert wird, sind möglich. Wesentlich ist lediglich, dass Materialien verwendet werden, die gegenüber einzubringenden Zellen 2 inert sind bzw. die eingebrachten Zellen nicht schädigen oder die sich von den Zellen 2 "umbauen" lassen.

Damit ein definierter Zellkulturraum im Inneren der Trägerstruktur 1 für die Zellen 2 gegeben ist und damit die Größe und Form des zu bildenden Implantates eingehalten wird, ist dafür zu sorgen, dass die Außenwand der Trägerstruktur 1 gegenüber Zellen undurchlässig ist. Hierzu kann die Trägerstruktur 1 vor dem Einbringen der Zellen 2 z.B. in ein Tauchbad 3 (siehe Fig. 2) eingetaucht werden. Das Tauchbad 3 kann z.B. ein flüssiges oder viskoses Polymer sein, das eine Grenzschrift 4 (siehe Fig. 3) für die ansonsten poröse Trägerstruktur 1 bildet. Als Polymere zur Bildung einer Grenzschrift können z.B. Harze verwendet werden.

Anstelle einem Polymer kann zur Verkapselung der Trägerstruktur 1 durch Bildung einer Grenzschrift 4 auch ein Alginatematerial verwendet werden, das in einer Kalziumchloridlösung in dem Tauchbad 3 polymerisiert wird. Eine derartige Grenzschrift 4 ist biologisch verträglich.

Die Grenzschicht 4 kann absolut dicht ausgebildet sein. Von Vorteil ist es jedoch, wenn sie wenigstens gaspermeabel ausgebildet ist. In diesem Falle kann durch die Grenzschicht 4 hindurch Sauerstoff eingebracht werden. Ebenso ist es auch möglich, eine Grenzschicht 4 zu bilden, die derart mikroporös ist, dass auch Nährstoffe durch die Grenzschicht 4 hindurch in das Innere der Trägerstruktur 1 diffundieren bzw. ein Stoffaustausch mit der Trägerstruktur, d.h. dem späteren Implantat, erfolgt.

Zur Zufuhr von Zellen 2, Nährmedium und gegebenenfalls einem Sauerstoffträger-Medium, z.B. Fluoridlösungen, Blut oder Blutersatzstoffe, kann die Trägerstruktur 1 mit einem Zulaufanschluss 5 versehen sein. Falls über den Zufuhranschluss 5 auch Nährstoffe in die Trägerstruktur 1 eingebracht werden sollen, kann man die Trägerstruktur 1 auch mit einem Ablaufanschluss 6 versehen, womit eine Durchströmung gegeben ist. Den Zulaufanschluss 5 und den Ablaufanschluss 6 kann man an die Trägerstruktur 1 vor dem Tauchbad 3 oder auch nach dem Tauchbad 3 einbringen, wobei selbstverständlich dafür zu sorgen ist, dass in dem Zulauf- und dem Auslaufbereich keine undurchlässige Grenzschicht 4 vorgesehen wird.

Die Trägerstruktur 1 kann als entfernbares oder auch als umwandelbares Platzhaltermaterial für die einzubringenden Zellen 2 ausgebildet sein. So kann z.B. für die Trägerstruktur 1 ein Material verwendet werden, das bei Zugabe von körpereigenen Zellen aufgelöst wird, z.B. durch Enzyme. Auf diese Weise wird eine körpereigene Matrix gebildet, die patientenspezifisch ist.



Als Grenzschrift 4 kann auch ein Gel verwendet werden, das eine geschlossene Membran als Grenzschrift bildet.

Nach Beendigung des Zellbildungsprozesses bzw. des aus den Zellen 2 gebildeten Implantates muss die Grenzschrift 4 wieder entfernt werden. Wenn sie aus biologischem Material ist, kann man sie entsprechend wieder biologisch abbauen, wie dies z.B. bei Gelen oder Alginaten der Fall ist. Hierzu kann die Trägerstruktur 1 mit der Grenzschrift 4 gemäß Fig. 4 wiederum in ein Bad 7 eingetaucht werden, das die Grenzschrift 4 abbaut. Bei Verwendung von Alginaten kann man hierfür eine Lösung verwenden, die Kalzium entzieht, so dass sich die Grenzschrift 4 entsprechend auflöst. Die Grenzschrift 4 kann auch so ausgebildet sein, dass sie sich durch enzymatische oder hydrolytische Prozesse selbst auflöst. Die Grenzschrift 4 kann auch vaskularisiert oder vorvaskularisiert (z.B. durch Endoter- oder Stammzellen) sein.

Bei Verwendung von Kunststoffen oder Silikon, welche sich nicht auf einfache Weise auflösen lassen, kann man die Grenzschrift 4 gegebenenfalls auch auf mechanische Weise entfernen. Um diese Entfernung zu erleichtern, kann zwischen der Trägerstruktur 1 und der Grenzschrift 4 eine Zwischenschicht angeordnet werden, die keine Bindung mit dem Material der Trägerstruktur 1 eingeht. Durch diese Zwischenschicht lässt sich dann die Grenzschrift 4 leichter ablösen. Hierfür kann z.B. eine Lipidschicht, eine Protein- und/oder Albuminschicht oder andere auflösbare oder ablösbare Schichten (biodegradabel oder erosionsfähige Schichten) verwendet werden.

Statt einer Zuführung von Zellen 2 über den Zulaufanschluss 5 kann gegebenenfalls auch die Trägerstruktur 1 z.B. in eine

wässrige oder pastöse Lösung eingetaucht werden, in der sich Zellen 2 zusammen mit Nährlösung befinden. In diesem Falle saugt sich die Trägerstruktur 1 entsprechend mit Zellen 2 und Nährlösung voll. Anschließend erfolgt die Verkapselung durch eine Grenzschicht 4 in dem Tauchbad 3.

Anstelle eines Tauchbades 3 kann selbstverständlich auch eine Grenzschicht 4 als Barriere für die Zellen 2 aufgespritzt oder aufgestrichen werden.

In Fig. 5 ist eine Ausgestaltung vorgesehen, wobei mehrere mit Grenzschichten 4 versehene Trägerstrukturen 1 in ein Nährmittelbad 9 eingebracht werden, damit der Wachstumsprozess in Gang gerät. Gegebenenfalls kann auch hier zusätzlich für eine Sauerstoffzufuhr in das Nährmittelbad 9 gesorgt werden.

In der Fig. 6 ist als Anwendungsbeispiel eine Trägerstruktur 1 in Form eines Röhrenknochens dargestellt, der ebenfalls innen- und außenseitig mit der Grenzschicht 4 versehen ist und ebenfalls einen Zulaufanschluss 5 und einen Ablaufanschluss 6 besitzen kann. In das Innere der Trägerstruktur 1 kann man dann als Zellen Stammzellen einbringen, die aus dem Knochenmark stammen, welche man z.B. mit Biopsie gewinnen kann. Die Stammzellen bilden dann aus dem fremden Trägerstrukturmaterial zunehmend zeitabhängig ein eigenes Knochenmaterial. Selbstverständlich muss das Material der Trägerstruktur 1 dann entsprechend auflösbar, z.B. aus Kalziumphosphat, gebildet sein.

Die Fig. 7 zeigt ausschnittsweise eine Herzklappe mit einem Edelstahlteil, z.B. Titanteil 10, um das außen die Träger-

struktur 1 angeordnet ist, wobei ebenfalls ein Zulaufanschluss 5 und ein Ablaufanschluss 6 vorgesehen sein können. In diesem Falle wird zusammen mit dem Titanteil 10 eine Trägerstruktur 1 vorgegeben, die der Form einer Herzklappe nachgebildet ist. Anstelle der Verwendung von Titan 10 kann auch eine Polyurethanprothese als Herzklappe verwendet werden.

Die Fig. 8 zeigt prinzipmäßig die Anordnung einer Trägerstruktur 1 mit Zellen 2 und einer Grenzsicht 4 in einem Kreislauf 11 mit einer Pumpe 12 und einem Medienreservoir 13. In dem Medienreservoir 13 können Zellen und/oder Nährlösung angeordnet sein. In den Kreislauf 11 kann auch ein Sauerstoffträger eingebunden werden.

Die Fig. 9 zeigt die Anordnung einer Trägerstruktur 1 in einem Behälter 14, in den eine Zulaufleitung 15 für Nährstoffe und/oder Sauerstoff mündet, welche mit dem Zulaufanschluss 5 verbunden ist. Eine Ablaufleitung 16 führt aus dem Behälter 14 heraus und ist mit dem Ablaufanschluss 6 verbunden.

Zusätzlich ist der Behälter 14 mit einem Anschluss 17 zur Einleitung von Druckmittel und gegebenenfalls auch mit einem Auslauf 18 zu dessen Ableitung versehen. Als Druckmittel kann ein Gas oder ein flüssiges Medium verwendet werden.

Es hat sich nämlich herausgestellt, dass die Bildung einer Zellschicht und das Zellwachstum deutlich verbessert wird, wenn man die Zellen 2 einer Druckbelastung aussetzt. Auf diese Weise werden noch bessere in-vivo-Verhältnisse geschaffen.

Durch die Druckbeaufschlagung der Trägerstruktur 1 über den unter Druck gesetzten Behälter 14 wird eine großflächige Druckbeaufschlagung erreicht, welche in-vivo-Verhältnisse sehr gut simuliert. Dabei können die Druckbelastungen auch wechselnd aufgebracht werden.

Die Fig. 10 zeigt hierfür eine mögliche Ausführungsform für Gelenkknorpeln, die auf einer Trägerstruktur 1, welche ein Kniegelenk darstellen soll, gezüchtet werden.

Für das Kniegelenk, welches ebenfalls eine Trägerstruktur 1' z.B. aus Trikalziumphosphat sein kann, können ebenfalls Zellen 2' auf nicht näher dargestellte Weise eingebracht werden. Gegebenenfalls kann zur Abgrenzung auch zwischen der Trägerstruktur 1' und der Trägerstruktur 1, in welcher Knorpelzellen 2 gezüchtet werden, eine Grenzschicht eingebracht werden, damit eine klar Trennung zwischen den Zellen 2 und 2' hergestellt wird.

Über den Zulaufanschluss 17 erfolgt eine Druckbeaufschlagung des Inneren des Behälters 14 durch eine Pumpe 19. Durch die Pumpe 19 können wechselnde Drücke in den Innenraum des Behälters 14 eingebracht werden. Wie dargestellt, ist in diesem Falle ein Ablaufanschluss 18 nicht unbedingt vorhanden.

Wie gestrichelt in der Fig. 10 angedeutet, kann um die beiden Trägerstrukturen 1 und 1' zusätzlich noch eine Schutzfolie 20 angeordnet sein. Die Schutzfolie 20 kann für einen Transport der Einheit aus den beiden Trägerstrukturen 1 und 1' vorgesehen sein und diese Einheit entsprechend steril abschließen. Durch die Ausbildung als elastisch dehnbare Folie 20 ist sichergestellt, dass die durch die Pumpe 19 aufge-

brachte Druckbelastung auf die Trägerstrukturen 1 und 1' weitergeleitet wird.

Anstelle von Trikalziumphosphat für die Trägerstrukturen 1 und 1' können im Knochenersatzbereich auch Collagene verwendet werden, wobei z.B. auch ein Meniskus gezüchtet werden kann. Ebenso sind Bindegewebsstrukturen, Polymere, wie Polylaktide oder andere chemische Strukturen, verwendbar. Wesentlich ist lediglich, dass sich aus diesen Materialien Formen erstellen lassen, die dem gewünschten Implantat entsprechen.

Zusätzlich lässt sich der Behälter 14 im Bedarfsfalle auch mit elektrischen Anschlüssen versehen, durch die man über nicht dargestellte Verbindungsleitungen elektrische Impulse den Zellen 2 und 2' auferlegen kann, womit ebenfalls noch besser in-vivo-Simulationen erzielt werden können.

Die in der Fig. 11 dargestellte Ausführungsform entspricht im wesentlichen der in Fig. 10 besprochenen Form, weshalb auch für die gleichen Teile die gleichen Bezugszeichen beibehalten worden sind.

Unterschiedlich ist lediglich, dass zusätzlich noch eine Meniskusstruktur 21 aufgebracht worden ist, über die wiederum eine Trägerstruktur 1" liegt.

Zur Vereinfachung ist in diesem Falle eine gegen Zellen 2 undurchlässige Grenzsicht 4 über die gesamte Einheit geschaffen.

Die Grenzschicht 4 kann auch durch Zellen selbst gebildet werden, die man dazu benutzt, ein Membran zu züchten. Auf der Trägerstruktur 1 wird dann z.B. Bindegewebe als Umkapselung gebildet. Dies kann z.B. durch Überwachungsprozesse mit Zellen, wie z.B. Chondrozyten, Fibroblasten oder Osteoblasten, erfolgen. Diese Zellen stellen dann praktisch Verpackungszellen und eine Grenzschicht für die zu züchtenden Zellen 2 dar.

### P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Züchten von Zellen (2), wobei die Zellen (2) zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum eingeleitet werden, der im Inneren einer Trägerstruktur (1) gebildet wird, wobei die Trägerstruktur (1) in ihrer Form und Größe wenigstens annähernd der durch die Zellen (2) zu bildenden Form, wie einem Implantat oder einer Prothese, entspricht, wobei der Trägerstruktur (1) Nährstoffe und/oder Sauerstoff zugeführt wird und wobei die Trägerstruktur (1) außenseitig mit einer gegenüber Zellen undurchlässigen Grenzschicht (4) versehen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Trägerstruktur (1) aus einem porösen gegenüber den Zellen (2) durchlässigen Material besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Trägerstruktur (1) als entfernbares oder durch die Zellen (2) umwandelbares Platzhaltermaterial ausgebildet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Trägerstruktur (1) Kalziumphosphat aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Trägerstruktur (1) zu Züchtungsbeginn mit Zellen und  
mit Nährlösung versehen wird, wonach die Grenzschicht  
(4) aufgebracht wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) aus einem biologischen oder synthe-  
tischen Material gebildet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) aus einem Hydrogel gebildet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) aus einem Alginat gebildet wird,  
das in einer Kalziumchloridlösung polymerisiert und nach  
Bildung der Zellschicht durch eine kalziumarme Lösung  
von der Trägerstruktur (1) wieder abgelöst wird.
9. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) durch eine Überwachsung mit Zellen  
gebildet wird, die eine Membran bilden.
10. Verfahren nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass



die Grenzschicht (4) durch Knorpelzellen oder Fibroblasten, Osteoblasten oder Chondrozyten gebildet wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) gaspermeabel ausgebildet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Grenzschicht (4) durch Aufspritzen eines gegenüber  
Zellen undurchlässigen Materials oder durch ein Tauchbad  
(3) aufgebracht wird.
13. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
zwischen der Trägerstruktur (1) und der Grenzschicht (4)  
eine Zwischenschicht eingebracht wird, die keine Verbin-  
dung mit der Trägerstruktur (1) eingeht.
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als Zwischenschicht eine Lipidschicht, Glykoproteine,  
Proteine oder biologisch abbaubare oder ablösbare  
Schichten eingebracht wird.
15. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
ein flüssiges oder viskoses Polymer als Grenzschicht (4)  
verwendet wird.
16. Verfahren nach Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Trägerstruktur (1) mit Zu- und Abläufen (5,6) für  
Sauerstoff und/oder Nährstoffe versehen wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Grenzschicht (4) mechanisch abziehbar ausgebildet  
wird.

18. Verfahren nach Anspruch 1,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Grenzschicht (4) ablösbar oder auflösbar ausgebildet  
und/oder vaskularisiert oder vorvaskularisiert wird.

19. Verfahren nach Anspruch 1,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
mehrere Trägerstrukturen (1) in eine Nährlösung einge-  
bracht werden.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
die Trägerstruktur (1) durch ein flüssiges oder gasför-  
miges Medium Druckbelastungen ausgesetzt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 20,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , d a s s  
wenigstens eine Trägerstruktur (1) in einen Behälter  
(14) eingesetzt wird, der durch ein Druckmedium (19) ei-  
nem wechselnden Gas- oder Flüssigkeitsdruck ausgesetzt  
wird.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21,

dadurch gekennzeichnet, dass um die Trägerstruktur (1) eine Schutzfolie (20) gelegt wird, die einen Druckraum um die Trägerstruktur (1) bildet, wobei die Schutzfolie (20) auf der von der Trägerstruktur (1) abgewandten Seite Druckbelastungen ausgesetzt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerstruktur (1) in einen Nährstoffkreislauf (11) eingebunden und mit einem Sauerstoffträger verbunden wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Kreislauf (11) ein Nährstoffreservoir (13) eingesetzt wird.

25. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerstruktur (1) mit Zu- und Abläufen (5,6) versehen und in einem mit Zu- und Abläufen (15,16) versehenen Behälter (14) eingesetzt ist.

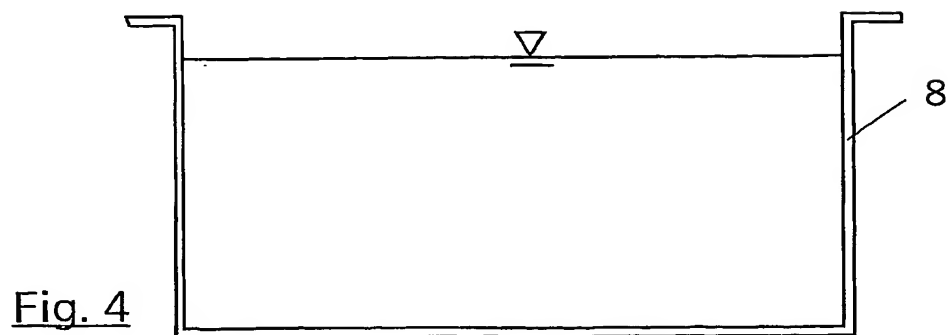
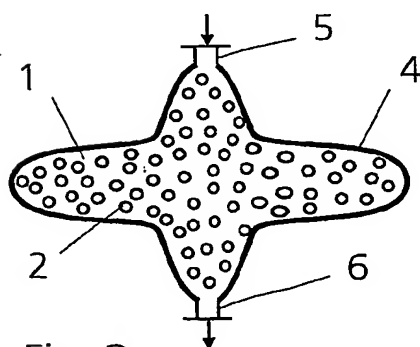
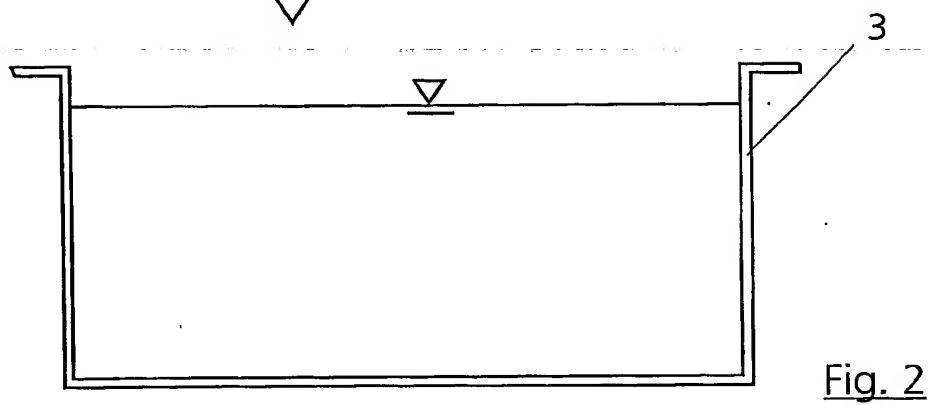
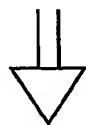
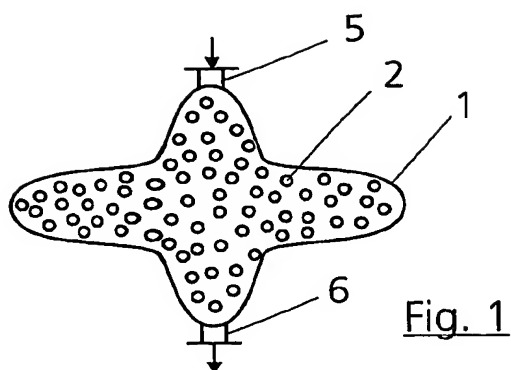
26. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerstruktur (1) in einen Nährstoffkreislauf (11) eingesetzt ist.

27. Vorrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass

die Trägerstruktur (1) in Form und Größe wenigstens annähernd einem Wirbelkörper entspricht.

28. Vorrichtung nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Trägerstruktur (1) in Form und Größe wenigstens annähernd einem Knochenteil entspricht.
29. Vorrichtung nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Behälter (14) mit wenigstens einem Druckanschluss (17) zur Verbindung mit einer Druckquelle (19) versehen ist.
30. Trägerstruktur zum Züchten von Zellen (2), wobei zur Bildung einer Zellschicht in einem Zellkulturraum im Inneren der Trägerstruktur (1) diese aus einem porösen Material gebildet und außenseitig mit einer gegenüber Zellen undurchlässigen Grenzsicht (4) versehen ist.

1/3



2/3

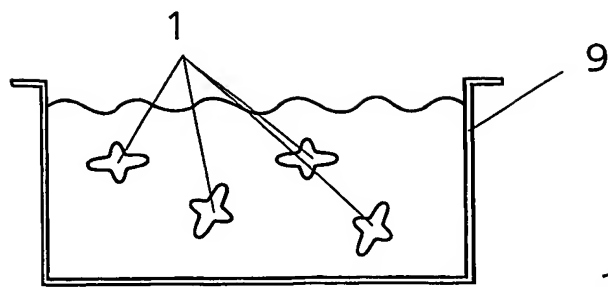


Fig. 5

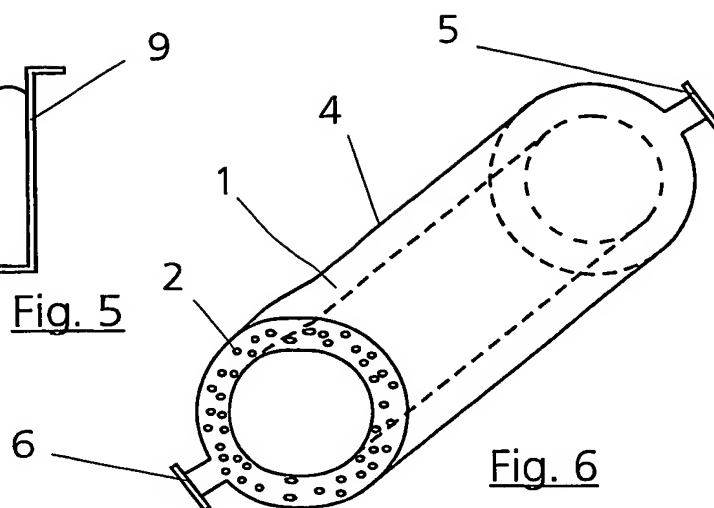


Fig. 6

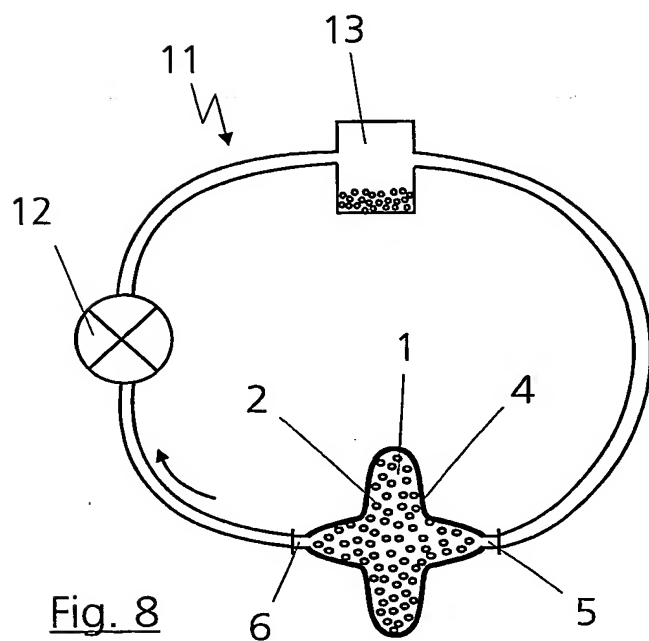


Fig. 8

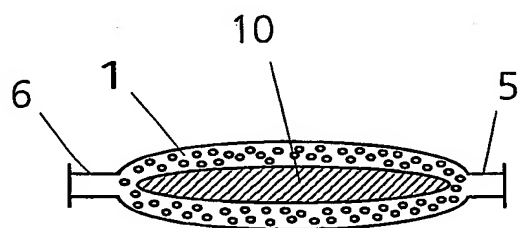


Fig. 7

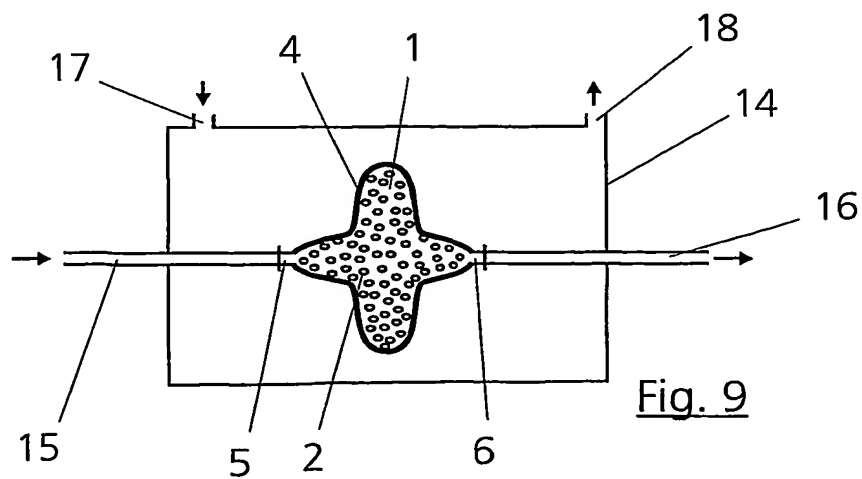


Fig. 9

3/3

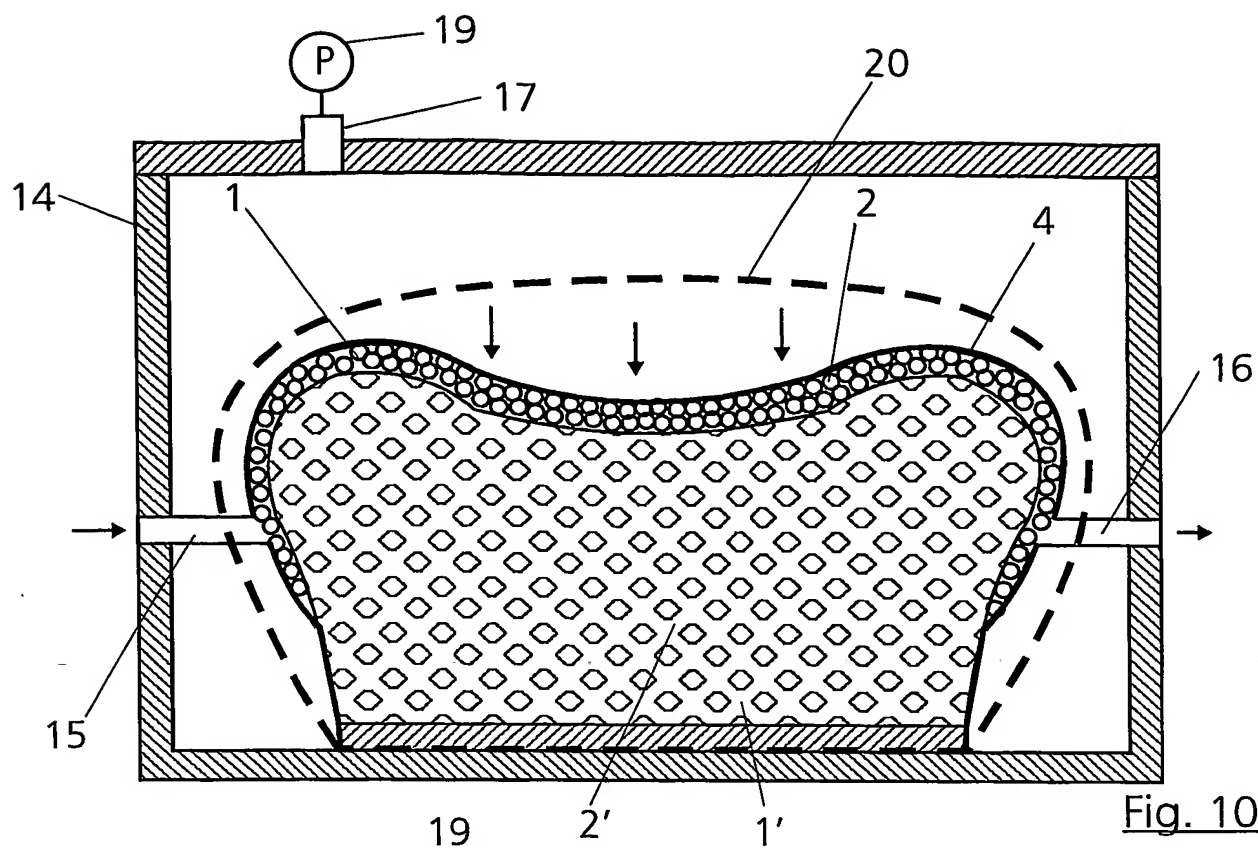
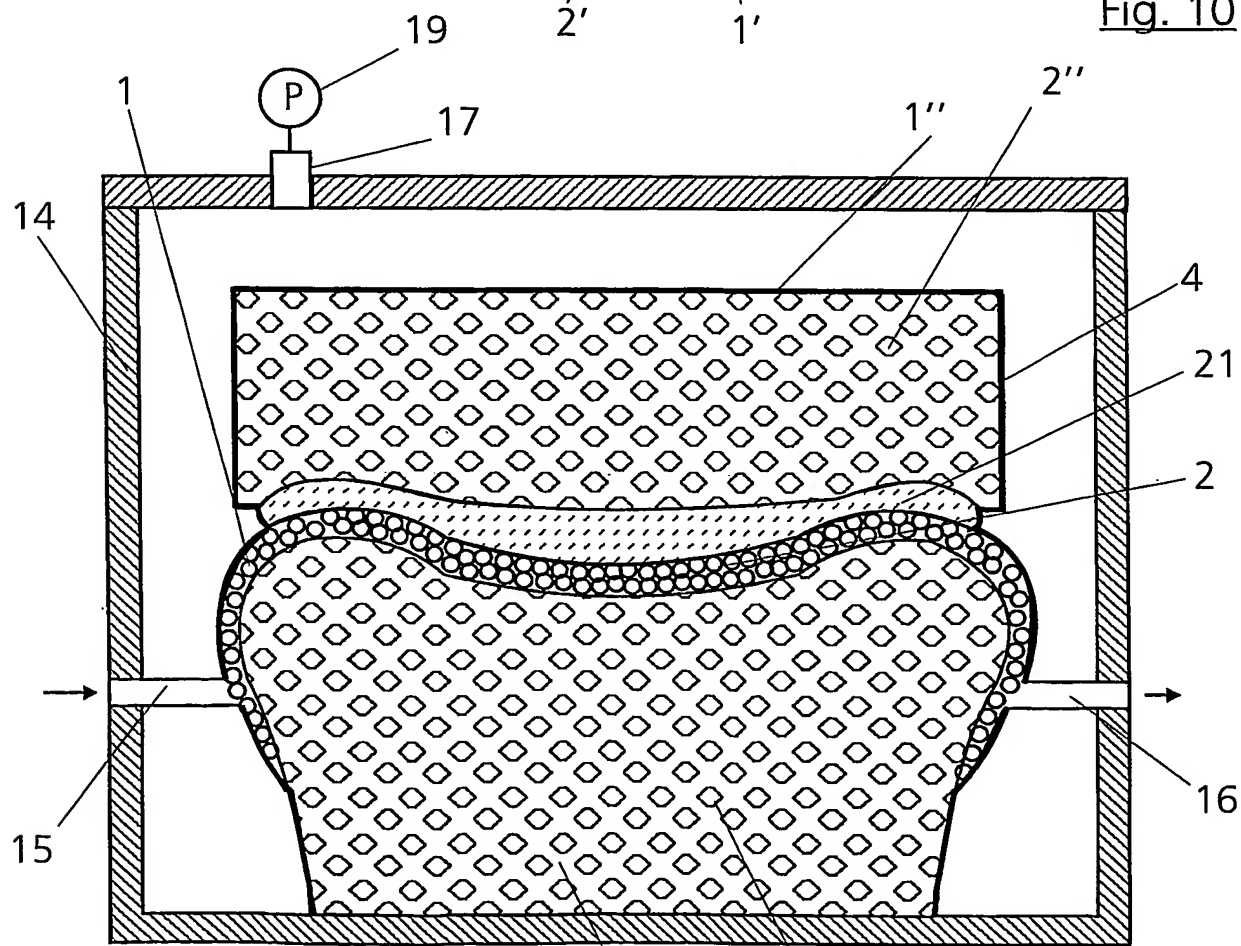


Fig. 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08325

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61L27/38 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M A61L A61F B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 35 643 A (BADER AUGUSTINUS) 1 February 2001 (2001-02-01) column 2, line 7 - column 3, line 19 column 3, line 40 - column 4, line 67 column 6, line 37 - line 67 figures 1-11 claims 1-40	1-30
X	DE 197 19 751 A (BADER AUGUSTINUS DR MED) 12 November 1998 (1998-11-12) cited in the application column 2, line 9 - line 59 column 3, line 12 - line 58 figures 1-4 claims 1-16	30
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 2003

Date of mailing of the international search report

22/12/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Menidjel, R



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08325

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 02 24861 A (BADER AUGUSTINUS)  28 March 2002 (2002-03-28)  page 2, paragraph 3 -page 3, paragraph 1  figures 1-4  claims 1-25</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-30
P, X	<p>DE 101 04 008 A (BIONETHOS HOLDING)  1 August 2002 (2002-08-01)  column 1, line 45 -column 2, line 26  column 2, line 43 -column 3, line 31  figures 1,2  claims 1-10</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08325

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19935643	A	01-02-2001	DE 19935643 A1	01-02-2001
			AU 6560200 A	19-02-2001
			CA 2387549 A1	08-02-2001
			CN 1382209 T	27-11-2002
			DE 29923810 U1	19-04-2001
			WO 0109282 A2	08-02-2001
			EP 1198555 A2	24-04-2002
DE 19719751	A	12-11-1998	DE 19719751 A1	12-11-1998
			AT 237677 T	15-05-2003
			AU 727629 B2	14-12-2000
			AU 7763698 A	08-12-1998
			DE 59807973 D1	22-05-2003
			WO 9851779 A1	19-11-1998
			EP 0983341 A1	08-03-2000
			JP 2001524830 T	04-12-2001
			NO 995240 A	27-10-1999
			US 6468792 B1	22-10-2002
WO 0224861	A	28-03-2002	DE 10046175 A1	28-03-2002
			AU 8979101 A	02-04-2002
			WO 0224861 A2	28-03-2002
			EP 1319062 A2	18-06-2003
DE 10104008	A	01-08-2002	DE 10104008 A1	01-08-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08325

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61L27/38 C12M3/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M A61L A61F B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruchs Nr.
X	DE 199 35 643 A (BADER AUGUSTINUS) 1. Februar 2001 (2001-02-01) Spalte 2, Zeile 7 - Spalte 3, Zeile 19 Spalte 3, Zeile 40 - Spalte 4, Zeile 67 Spalte 6, Zeile 37 - Zeile 67 Abbildungen 1-11 Ansprüche 1-40	1-30
X	DE 197 19 751 A (BADER AUGUSTINUS DR MED) 12. November 1998 (1998-11-12) in der Anmeldung erwähnt Spalte 2, Zeile 9 - Zeile 59 Spalte 3, Zeile 12 - Zeile 58 Abbildungen 1-4 Ansprüche 1-16	30
	---	
	---/---	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

9. Dezember 2003

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

22/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Menidjel, R

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08325

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02 24861 A (BADER AUGUSTINUS) 28. März 2002 (2002-03-28) Seite 2, Absatz 3 -Seite 3, Absatz 1 Abbildungen 1-4 Ansprüche 1-25 ---	1-30
P,X	DE 101 04 008 A (BIONETHOS HOLDING) 1. August 2002 (2002-08-01) Spalte 1, Zeile 45 -Spalte 2, Zeile 26 Spalte 2, Zeile 43 -Spalte 3, Zeile 31 Abbildungen 1,2 Ansprüche 1-10 -----	1-30

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/08325

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19935643	A	01-02-2001	DE	19935643 A1	01-02-2001
			AU	6560200 A	19-02-2001
			CA	2387549 A1	08-02-2001
			CN	1382209 T	27-11-2002
			DE	29923810 U1	19-04-2001
			WO	0109282 A2	08-02-2001
			EP	1198555 A2	24-04-2002
DE 19719751	A	12-11-1998	DE	19719751 A1	12-11-1998
			AT	237677 T	15-05-2003
			AU	727629 B2	14-12-2000
			AU	7763698 A	08-12-1998
			DE	59807973 D1	22-05-2003
			WO	9851779 A1	19-11-1998
			EP	0983341 A1	08-03-2000
			JP	2001524830 T	04-12-2001
			NO	995240 A	27-10-1999
			US	6468792 B1	22-10-2002
WO 0224861	A	28-03-2002	DE	10046175 A1	28-03-2002
			AU	8979101 A	02-04-2002
			WO	0224861 A2	28-03-2002
			EP	1319062 A2	18-06-2003
DE 10104008	A	01-08-2002	DE	10104008 A1	01-08-2002